Beitrag

zur

mineralischen Nahrung der Pilze.

NATURAL HISTORY LIBRARY

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der hohen philosophischen Fakultät

der

k. b. Friedrich-Alexander-Universität Erlangen

vorgelegt von

Ernst Günther
aus Suhl.

Tag der mündlichen Prüfung: 10. März 1897.

Erlangen 1897.
K. bayer. Hof- und Univ.-Buchdruckerei von Fr. Junge (Junge & Sohn).

V.22
G55b
589.22
G95b
Bishop

Seinen teuren Eltern

in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

vom Verfasser.

Botany 19 Apr 20 Dultz mk. 2
p43992

Allgemeiner Teil.

Während den Chlorophyllpflanzen bezüglich ihrer Ernährung und speziell ihrer Mineralbedürfnisse weitgehende und sorgfältige Studien gewidmet worden sind, hat man sich mit der Zucht von Pilzen in Medien, deren chemische Zusammensetzung genau bekannt ist, nur wenig beschäftigt.

Zwar gab die von Pasteur[1]) entdeckte Spaltung der Traubensäure durch Pilze (durch Bakterien 1858 und durch Penicillium glaucum 1860) in eine die Ebene des polarisierten Lichtes nach links und eine nach rechts drehende Weinsäure vielen Chemikern Veranlassung, sich mit diesen niederen Organismen zu beschäftigen, jedoch traten dabei naturgemäss die physiologischen Probleme in den Hintergrund und es gingen die Forschungen nur darauf hinaus: Erfahrungen über stereoisomere organische Verbindungen zu gewinnen. Von rein physiologischem Standpunkte aus sind über die mineralische Ernährung der niederen Pilze inklusive Bakterien seitdem vier umfassende

---

1) Comptes rendus Bd. 46 (1858) p. 617 und Bd, 51 (1860) p. 298.

Untersuchungen veröffentlicht worden. Die erstere von Raulin im Jahre 1869, welcher mit Benutzung einer von ihm zusammengesetzten Nährlösung „Liquide Raulin“ Aspergillus niger züchtete, vorwiegend, um die Bedeutung der einzelnen Mineralstoffe für die Ernährung festzustellen, und die zweite von Nägeli im Jahre 1874, dessen ausführliche Versuche sowohl die Bedeutung der Aschenbestandteile als auch den Nährwert der verschiedenen Kohlen und Stickstoffquellen ermittelten. In jüngster Zeit haben sich Benecke und Molisch eingehend mit dieser Frage befasst, während sie von vielen anderen Forschern nebenbei gestreift wird.

Raulin[1]) geht im Laufe seiner Abhandlung auch auf die „chemischen Gesetze der Produktion des Schimmelpilzes Aspergillus niger“ in einem künstlich zusammengesetzten Medium ein. Seine Hauptresultate hierbei sind folgende: „Säht man Sporen von Aspergillus niger in ein bestimmtes künstliches Medium unter geeigneten Umständen, so erhält man etwa bis $^1/_{20}$ ihres Wertes konstante Ernten und zwar reichlicher als auf den günstigsten natürlichen Medien.“ Raulins Nährmedium besteht (in geeigneten Proportionen) aus Zucker, Wasser, Weinsteinsäure, Ammoniak, Phosphorsäure, Kalium, Magnesium, Schwefelsäure, Zinkoxyd und Kieselsäure. Das gleichzeitige Zusammenwirken aller dieser Körper ist wesentlich,

---

1) Etudes chimiques sur la vegetation. — Recherches sur le developpement d'une mucedinée dans un milieu artificiel. Annales des sciences naturelles Ser V Botanique T. XI 1870.

denn die Entziehung irgend eines derselben vermindert das Erntegewicht oft selbst in beträchtlichem Masse.

Nach Nägeli[1]) gebrauchen die Pilze zu ihrer normalen Entwicklung kein so kompliziert zusammengesetztes Nährmedium, wie das zitierte „Liquide Raulin“ ist. Er sagt „Die Pilze bedürfen wie die übrigen Pflanzen, ausser den Verbindungen, die ihnen Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff zuführen, noch gewisser mineralischer Stoffe, deren Anwesenheit bei dem Chemismus notwendig ist, oder deren Elemente in die Konstitution der Substanz eintreten. Aber Pilze machen bezüglich der Auswahl verhältnismässig geringe Ansprüche. Sie können mit vier Elementen auskommen, nämlich: 1. Schwefel, 2. Phosphor, 3. einem der Elemente Kalium Rubidium oder Cäsium, 4. einem der Elemente Calcium, Magnesium, Baryum oder Strontium. Was das Kalium als Nährstoff betrifft, so ergeben die Kulturversuche, dass es durch folgende Elemente: Natrium, Lithium, Baryum, Strontium, Calcium und Magnesium nicht ersetzt werden kann, auch nicht durch Ammonium, wohl aber durch Rubidium und Cäsium. Salze der beiden letzteren Elemente ernähren die Pilze ebensogut, wo nicht besser als Kaliumsalze. — Calcium, Magnesium, Strontium und Baryum können sich gegenseitig vertreten und das Vorhandensein einer dieser alkalischen Erden reicht aus, um eine völlige Entwicklung zu gestatten.“

Die neueren Arbeiten über die Nahrung der Pilze, angestellt vornehmlich mit Aspergillus niger, Peni-

1) Ernährung der niederen Pilze. Botan. Mitteil. Bd. III p. 476.

cillium glaucum und Saccharomyces sind zum Teil in Widerspruch mit den soeben zitierten Angaben unseres verdienten Münchner Forschers geraten. Benecke[1]) sagt bezüglich der Vertretbarkeit des Magnesiums gegenüber den alkalischen Erden übereinstimmend mit Molischs[2]) Urteil, dass Magnesium unbedingt notwendig und durch kein anderes Element vertretbar sei. Über die Alkalien lautet Beneckes Befund: „Kalium kann nicht durch Natrium oder Lithium vertreten werden". Bezüglich des Rubidiums, das ja ungemein schwer von Kalium ganz befreit werden kann, fasst er seine Resultate wie folgt zusammen: „Zwei Seelen streiten sich in der Brust des Rubidiummolekel, die eine möchte die Funktionen des Kalium im Pilz ersetzen, die andere wirkt ihnen entgegen und ist ein Gift für den Pilz. Es resultiert hieraus, dass in einer möglichst kaliumfreien Rubidiumnährlösung die Aspergillusspore wohl vegetativ auskeimt, nicht aber Conidien bilden kann, ja die Anlage der Conidienträger unterbleibt. In guten Nährlösungen ist das Gewicht der sterilen Rubidiumdecke ungefähr gleich dem einer entsprechenden Kaliumdecke; in schlechteren tritt die hemmende Wirkung des Rubidiums mehr hervor, es erzeugt nur viel grösseres Erntegewicht.

---

1) Berichte der deutsch-botan. Gesellsch. 1894. Generalversammlungsheft p. 105—117. Ein Beitrag zur mineral. Nahrung der Pflanzen. Pringsheims Jahrbücher für wissensch. Bot. Bd. XXVIII p. 487 u. f. Botan. Zeitung 1896 Heft VI.

2) Abhandl. über die mineral. Bedürfnisse der nied. Pilze. Sitzungsbericht der Wiener Akad. Math.-naturw. Kl. Bd. CII. Die Pflanze in ihren Beziehungen zum Eisen. Jena 1892.

Enthält das Rubidiumsalz hingegen auch Kalium, so kommt die vereinigte Rubidium-Kaliumwirkung zur Geltung, sodass meist ein bedeutend höheres Erntegewicht erzeugt wird als in blossen Kaliumkulturen". Bezüglich der Bedeutung des Eisens pflichtet Benecke im wesentlichen den Angaben von Molisch bei, welcher den Beweis erbracht hat, dass das Eisen für Aspergillus niger unbedingt notwendig ist. Auch Benecke erhielt bei seinen Untersuchungen im allgemeinen eine geringe Förderung durch Zusatz von Ferrosulfat. Hinsichtlich des Zinks fand er, dass dieses zwar das Trockengewicht gegenüber eisenarmen Kulturen fördert, die Sporenbildung hingegen beeinträchtigt.

Gegen einen Teil dieser Anschauungen und speziell ihre Verallgemeinerung wendet sich Wehmer[1]) nicht nur in theoretischer Hinsicht, indem er nicht von einer „Funktion der einzelnen Elemente" gesprochen wissen will, vielmehr von einer „Verarbeitung oder Zersetzung der Salze", sondern auch in seinen Resultaten differiert er mit denen von Nägeli, Molisch und Benecke. Während die drei letzteren Autoren finden, dass das Natrium nicht im stande ist, das Kalium zu ersetzen und das geringe Wachstum in kaliumfreien Natriumkulturen den Verunreinigungen der angewandten Substanzen zuschreiben, sagt Wehmer: „Natriumsalze sind denen des Kaliums allerdings nicht gleichwertig, aber sie werden doch verarbeitet", und weiter: „Die Kaliumsalze der Phosphorsäure und Salpetersäure können allerdings von denen des Natriums,

1) Berichte d. deutsch-botan. Gesellsch. 1895 Heft VI. Zur Frage nach dem Werte der einzelnen Mineralstoffe für Pilze.

wenn auch mit ungünstigerem Erfolge vertreten werden, in gleicher Weise, wie gegebenenfalls die verschiedenen Stickstoffträger (Pepton, Salmiak, Kalknitrat etc.) einander mit einem für die Einzelfälle ungleichen Erfolge ersetzen."

Dies sind in Kürze die Resultate der Arbeiten, die bis heute über die mineralische Nahrung der Pilze vorliegen; sie sind mit äusserst wenig Pilzspezies (meist Aspergillus niger) gewonnen und lassen sich schon deshalb nicht verallgemeinern. Die Zusammensetzung der Nährlösung und deren Konzentration muss noch bedeutend mehr variiert werden, ehe sichere theoretische Schlüsse gezogen werden können. Einen kleinen Beitrag zu diesem interessanten Thema soll die vorliegende Arbeit liefern, deren Anregung ich meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. M. Rees, verdanke. Für seine Unterstützung bei Ausführung derselben sage ich ihm gerne an dieser Stelle meinen Dank. Ebenso bin ich Herrn Assistenten Dr. K. Becker für manche Belehrung zu Dank verpflichtet.

Methodisches.

Bevor ich an die umstrittenen Fragen herantrete, halte ich für unbedingt nötig, die Beschreibung der speziellen Arbeitsmethoden und vor allem die zu den Versuchen verwendeten Materialien zu besprechen, da oft kleine Differenzen in der Arbeitsweise grosse Verschiedenheiten in den Resultaten veranlassen.

Sind schon die anzuwendenden anorganischen Präparate zum Teil nicht leicht genügend rein zu erhalten, so wird man absolut reine organische Sub-

stanzen, die eine gute Pilzentwicklung gestatten, überhaupt kaum erhalten können und ebenso schwer ist ein ideal reines Wasser zu beschaffen. Als solches diente mir ein frisch aus einem verzinnten Kupferapparate destilliertes. Absolut reines destilliertes Wasser kann nur durch vorsichtige Destillation von möglichst reinem Wasser aus Platin oder Silberretorten und Kondensation der entweichenden Dämpfe in einem Kühlrohre und einer Vorlage aus ebensolchem Metalle erhalten werden. Ein solches stand mir aber leider nicht zur Verfügung. (Eine sehr gute Probe auf die relative Reinheit des destillierten Wassers bieten übrigens die Pilzsporen selbst. Säht man nämlich einige Sporen, am besten von verschiedenen niederen Pilzen, in einen hängenden Tropfen des zu untersuchenden Wassers aus, so kann man aus dem früheren oder späteren Auskeimen sowohl, wie vor allem aus der Grösse der eventuell entstandenen Keimschläuche sehr wohl auf die Reinheit des Wassers schliessen.) Ich erhielt im Durchschnitt nach 25—30 Tagen eine mikroskopisch sichtbare Keimung einzelner Sporen. Viele keimten auch nach dieser Zeit noch nicht. Die teilweise gebildeten Keimschläuche starben infolge von Nahrungsmangel rasch wieder ab. Auf Grund dieser Erscheinung kann ich das verwendete Wasser für die vorliegende Untersuchung als völlig genügend rein bezeichnen.

Zu den verwendeten anorganischen wie organischen Präparaten wurden die reinsten Marken bezogen und durch mehrmaliges Umkristallisieren, eventuell Umfällen mit Alkohol gereinigt. Der häufig angewendete Salmiak war völlig neutral, enthielt weder Kalium noch Natrium und wurde durch Titration mit Zehntel-

normalsilberlösung auf seine richtige Zusammensetzung und so zugleich auf seine Reinheit geprüft; die sonst noch nötigen anorganischen Salze wurden mikrochemisch untersucht und nur völlig reine fanden Verwendung.

Von organischen Substanzen, auf deren Reinheit man besondere Sorgfalt verwenden muss, da sie in relativ grosser Menge benutzt werden, gebrauchte ich vor allem Rohrzucker, Leucin, Asparagin, Pepton, Glycerin und essigsaures Ammonium. Diese Körper waren gewählt mit Hinsicht auf ihre allgemeine physiologische Bedeutung als Nährstoffe für chlorophyllfreie Pflanzen. Saccharose als Vertreter der Kohlenhydrate zog ich dem sonst für Ernährungszwecke häufiger benutzten Traubenzucker deshalb vor, weil ich ihn für reiner erkannte als den letzteren und weil nach Sachsse „die Eiweisskörper, Kohlenhydrate und Fettstoffe p. 149“ der Pflanzenzucker in allen gut untersuchten Fällen ein Gemenge gleicher Teile Dextrose und Lävulose von derselben Natur ist, wie dasjenige, das bei der Inversion des Rohrzuckers entsteht. Invertiert wird aber hier der Rohrzucker bei der Sterilisation der immer durch die Salze etwas sauren Lösung. Mein am häufigsten benutzter zweimal umkristallisierter Rohrzucker[1]) (von Dr. Grübler und Comp. Leipzig) hatte aber immer noch eine ganz

---

1) Aschengehalt betrug nach meiner Bestimmung 0,02%, welchen ich auf keinem mir bekannten Wege verringern konnte. Es sei mir an dieser Stelle gestattet, Herrn Privatdozenten Dr. Schmidt für die Unterstützung zu danken, welche er mir bei der spektroskopischen Arbeit im hies. physikal. Institut zu teil werden liess.

geringe weisse Asche, in der spektroskopisch Kalium nicht mit Sicherheit, Spuren von Calcium und Magnesium aber nachweisbar waren. Obwohl die Saccharose von der Firma als „schwefelfrei“ bezeichnet war und auch der Nachweis von Schwefel mir misslang, konnte ich doch im Verlaufe der Arbeit durch den Pilz selbst den Schwefelgehalt konstatieren. Pepton als Repräsentant der Eiweissstoffe benutzte ich nur bei Versuchen mit Thamnidium elegans aus später zu erwähnenden praktischen Gründen. Glycerin und essigsaures Ammonium sind, obwohl schlechte Nährmedien, doch zu einigen Kontrollversuchen verwendet worden, weil sie die meiste Garantie für Reinheit boten. Leider keimten häufig Pilzsporen in essigsaurer Ammoniumlösung gar nicht aus.

Eine weitere Fehlerquelle besteht darin, dass nicht nur während der Sterilisation, sondern auch während der oft langen Dauer des Versuches stets ein geringes Quantum Nährsalze und Wasser verdunstet (namentlich Ammoniak aus Salmiak) andererseits aber etwas Substanz aus der Wand der Kulturgefässe in die Lösung eindringt. Das Einfallen von Staub und sonstigen störenden Agentien während der Versuchsdauer wurde dadurch zu vermeiden gesucht, dass die sämtlichen Kolben mit einem mässig fest schliessenden Watteprop versehen wurden.

Während die entstehenden Unterschiede in der Zusammensetzung der Nährlösung durch Wasser- und Salzverdunstung bei jedem Beobachter, gleich lange Sterilisation und Dauer des Versuches vorausgesetzt, verhältnismässig gleich sein werden, ist die Anwendung von verschiedenen Glassorten der Kulturkolben

oft von sehr verschiedenen Folgen begleitet. So zeigt Benecke einen beträchtlichen Unterschied bei der Benutzung von böhmischem Geräteglas von Kavalier gegenüber Jenaer Geräteglas und Resistenzglas von Ehrhardt und Metzger, indem in einer kaliumfreien Nährlösung die beiden ersteren Glassorten bei Impfung mit Aspergillus niger bedeutende Vegetation aufwiesen und reichlich Conidien entwickelten, während in den Kolben aus den beiden letzteren Glassorten der Pilz nur spärlich gedieh und ganz ohne Conidien blieb. Um nicht durch diese Einzelheiten vom Thema zu weit abzuschweifen, verweise ich in diesem Falle auf die in der Zeitschrift für Instrumentenkunde erschienenen Abhandlungen von Schott, Mylius und Foerster in den Jahrgängen 1889, 91. 92 und 94. In Anbetracht der Verschiedenheit der im Handel befindlichen Glassorten benutzte ich, wenn es mir um Ausschluss des Kaliums zu thun war, Jenaer Geräteglas, das nach Mitteilung der Firma Schott und Genossen absolut kein Kalium enthält, während ich im übrigen gewöhnliches gutes Kaliglas verwendete. (Dass das Jenaer Glas wirklich kein Kalium an die Nährlösung abgab, ergab ein einfacher Versuch: Eine kaliumfreie Nährlösung wurde 1. im Jenaer Geräteglaskolben und 2. im Kaliglaskolben mit Rhizopus nigricans geimpft. Der Unterschied der beiden Glassorten trat schon nach vier Tagen hervor, indem der Pilz im Kaliglaskolben stark fruktifizierte, während die Flüssigkeit im Jenaer Glaskolben nur trüb war, der Pilz also kaum gekeimt hatte.) Die erste Sterilisation fand stets im Jenaer Geräteglaskolben statt, weil beim Erhitzen auf 100° dessen Löslichkeit nicht

in demselben Masse zunimmt, wie die der anderen Gläser. Die Erfahrungen, die bis jetzt mit Metallgefässen bei Pilzkulturen vorliegen, sind wenig ermutigend, weshalb ich von deren Verwendung ganz absah[1]).

Die zu den Versuchen benutzten Kolben, welche neu erst mit Salzsäure, dann mit Ammoniak ausgewaschen und lange Zeit ausgedämpft waren, hatten die Erlenmeyersche Form und waren so gross, dass sie von der Nährlösung zu $^1/_5$ angefüllt wurden. Diese war an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je eine Stunde im Kochschen Dampfsterilisationsapparat keimfrei gemacht und wurde unter Vermeidung jeden Verzugs den Versuchsgefässen genau zugemessen und diese dann mit einem Watteprop von möglichst gleicher Dichtigkeit geschlossen, so dass der Sauerstoff der Luft den Pilzen in gleicher Menge zur Verfügung stand. Darauf wurden die eventuell noch mit Zusätzen versehenen Kulturgefässe nachmals eine halbe Stunde sterilisiert und nach dem Erkalten mit Pilzsporen infiziert. Dies „Impfen“ geschah in der Weise, dass eine grosse Anzahl Sporen in sterilisiertem destilliertem Wasser verteilt und diese Flüssigkeit sofort durch sterilisierte Watte und ebensolchen Trichter in ein gleichfalls sterilisiertes Gefäss gegossen wurde, so dass die eventuell zufällig in das Wasser gelangten Mycelfäden etc. auf der Watte zurückblieben. Es resultierte auf diese Weise eine durch die herum-

---

1) Bokorny, Bot. Centralblatt LXII Nr. I. Benecke l. c. p. 492. Raulin p. 220.

schwimmenden Sporen opalisierende Flüssigkeit, welche nach möglichst geringem Öffnen des Watteverschlusses kubikzentimeterweise mittelst einer vorher sterilisierten Pipette den Kulturkolben hinzugefügt wurde. So wurde für völlige Übereinstimmung in der Tiefe der Flüssigkeit gesorgt, auch wurde völlige Gleichheit der Beleuchtung, der Temperatur u. s. w. hergestellt. Im allgemeinen wurde mit Kulturen im zerstreuten Tageslicht gearbeitet.

Zunächst verfolgte ich mit blossem Auge den Entwicklungsgang des Pilzes in den einzelnen Kolben und erst, wenn ein deutlicher Unterschied zu bemerken war, unterbrach ich die Kulturen, um eventuell das Trockengewicht der Pilzmasse zu bestimmen. Wohl bin ich mir dabei bewusst, dass die Zahlen, welche die quantitativen Bestimmungen ergeben, nicht unbedingt richtige und einwurfsfreie Anhaltspunkte liefern, doch behielt ich diese sehr viel Zeit raubende Methode der Kontrolle halber bei. Benutzt man hierbei stets dasselbe Filtrierpapier, so werden im allgemeinen die entstehenden Fehler gleich sein, da durch dasselbe immer gleich viel Sporen hindurch gelassen werden; ist dagegen eine sterile Pilzdecke mit einer fertilen gewichtlich zu vergleichen, so muss man wohl berücksichtigen, dass das Gewicht der letzteren um ein Geringes hinter dem Wirklichen zurückbleibt, weil eben ein Teil der Sporen durch das Papier hindurchgeht. Doch ist dieser Verlust gering, sodass wir ihn hier, wo wir ein relativ hohes Erntegewicht erzielt haben, vernachlässigen können. Zweitens beeinflussen das Gewicht noch die an der Pilzmasse mechanisch haftenden Nährsalze; zu ihrer Entfernung spülte ich

die Pilzdecke einmal mit destilliertem Wasser ab. Durch zu häufiges Nachwaschen lief ich wieder Gefahr, der Pilzmasse die von ihr aufgenommenen Salze zu entziehen. Ich verfuhr also bei den Gewichtsbestimmungen in der Weise, dass ich die Pilzdecke auf ein bei 100° getrocknetes und im Exsiccator erkaltetes gewogenes Filter brachte, mit ca. 50 cbcm destilliertem Wasser nachwusch, Filter nebst Inhalt bei 100° trocknete und nach dem Erkalten im Exsiccator wog.

Wenn es endlich gilt, die Wasserkultur gegenüber der auch von mir mit geringem oder negativem Erfolg versuchten Sand-, Glas- oder Kieselsäuregallerte-Kultur zu verteidigen, so ist hier anzuführen. dass man bei ersterer jeden Vorgang in der Flüssigkeit und im Mycel des Pilzes leicht beobachten kann und ausserdem ein nährstofffreies Wasser immer noch leichter zu beschaffen ist, als ein ganz unlöslicher fester Körper, der die Eigenschaften der natürlichen Unterlagen besitzt. Mag man dazu Pferdehaare wie Saussure oder gereinigten Quarzsand wie Wiegmann und Polsdorff oder Zuckerkohle wie Salm-Horstmar endlich sogar Bergkristallpulver in Gefässen aus filtriertem weissen Wachs nehmen, in keinem Falle wird ein solcher Boden als indifferent zu betrachten sein, da aus ihm anorganische und durch Zersetzung bei Haaren, Wachs etc. organische Substanz in Lösung gehen wird. Berücksichtigen wir dabei, dass die Gesamtmenge der vom Pilze aufgenommenen anorganischen Stoffe überhaupt nur gering ist, so ist doch diese Fehlerquelle gross genug, um das Resultat des ganzen Versuches unter Umständen völlig zu stören.

Versuchsobjekte.

Die Mannigfaltigkeit der Pilzformen ist eine sehr grosse; von den einfachsten mikroskopisch kleinen Bakterien finden sich zahlreiche Übergänge zu hochorganisierten Formen zu den oft kilogrammschweren Gasteoromyceten. Die Auswahl aus dieser reichhaltigen Pflanzengruppe gedachte ich dem Zufall zu überlassen. So fand ich im Sommer 1896 Ustilago carbo, Flug oder Staubbrand, auf Hafer-, Ustilago violacea (U. antherarum) auf Saponaria, Ustilago longissima auf Glyceria und Tilletia Tritici (T. caries) Schmier oder Stinkbrand, auf Weizen. Diese alle boten mir aber leider kein zu meinen Versuchen genügendes Bild, da ich den Entwicklungsgang des betreffenden Pilzes nicht von Spore zu Spore verfolgen konnte. Die Ustilagineen leben bekanntlich parasitisch auf höheren Pflanzen, vorzugsweise auf unseren Kulturgräsern und Getreidearten, wo sie durch ihr Auftreten den Wert der Ernte häufig bedeutend beeinträchtigen. Die Bildung von Sporen ist bei rein saprophytischer Ernährung nur selten gelungen; nur Brefeld hat Sporen von Tilletia im Mistdekokt auf sehr umständliche Weise nach langem Bemühen erzogen. Lässt man nämlich Ustilagineensporen in Wasser keimen, so entstehen Schläuche von zylindrischer Form, die sich gewöhnlich in einige Zellen teilen, selten sind einzellige Formen (Tilletia). Diese Zellen, Promycelien genannt, treiben meist seitlich, bei Tilletia an der Spitze, zu Sporidien aus, welche dann erst die eigentlichen Keimschläuche entwickeln. Verteilt man dagegen Ustilagineensporen in Nährlösung, so ist oft in

überraschend kurzer Zeit die ganze Kultur erfüllt mit Hefezellen, in allen Stadien der Sprossung begriffen. Aus allen diesen Ustilagineenhefen resultierten, soweit ich auch meine Nährlösung variierte immer nur Hefe. Auch Brefeld hat trotz jahrelanger Fortsetzung der Kulturen nie aus solcher Hefe den ursprünglichen Pilz erzogen. Da die Ustilagineen auf verhältnismässig tiefer Stufe im Pilzsystem stehen und Versuche mit Schimmelpilzen über Stoffwechsel schon vorlagen, hoffte ich auf Grund deren Ergebnisse bei den Ustilagineen auf ähnliche Resultate und habe mich speziell mit dieser Pilzgattung ein ganzes Semester hindurch vergeblich beschäftigt. Die Bildung der Chlamydosporen erfolgt in der Natur immer nur in der lebenden Nährpflanze, indem sich das Mycel durch Querwände in kurze Glieder teilt, welche alsdann anschwellen und losgelöst die Pilzsporen darstellen. Auch Versuche wägbare fertile Pilzmassen in bekannter flüssiger Nährsubstanz von Pilobolus, dessen derbwandige Sporen zur Reifezeit mit grosser Heftigkeit weggeschleudert werden, von Ascobolus, den Pezizaceen nahestehend und häufig auf Mist erscheinend, von Coprinus und Bovista schlugen fehl. Die Sporen dieser Spezies keimten zwar alle, doch brachten es die Keimschläuche in Flüssigkeiten allermöglichen Konzentration und Zusammensetzung nicht zu makroskopisch sichtbarem Mycel. So sah ich mich denn gezwungen meine Versuche über Ernährung speziell mineralischer Natur mit den am meisten zu physiologischen Zwecken benutzten Schimmelpilzen anzustellen, weil sich dieselben auf den verschiedensten Substraten schnell entwickeln und nach mannigfacher Erfahrung auch in flüssigen

Medien gut gedeihen. Aus dieser Familie standen mir zur Verfügung: 1. Phycomyces nitens, den ich dem Institute verdanke, 2. Thammidium elegans, das ich auf Brod, 3. Phizopus nigricans, den ich auf eingemachten Früchten fand und 4. Mucor corymbifer, dessen Kolonien ich erhielt, wenn ich frisches Weissbrot einige Tage feucht bei Bruttemperatur aufbewahrte.

Die Versuche mit Phycomyces nitens musste ich bald einstellen, da der Pilz in Nährlösung mit Traubenzucker, Rohrzucker oder Glycerin als Kohlenstoffquelle nur äusserst spärlich gedieh. Häufig bildete sich aus dem sehr zarten und geringen Mycel nur ein einziger Fruchtträger und Zusätze verschiedener Mengen anorganische Nährsalze hatten absolut keinen Einfluss auf das Wachstum dieses Pilzes. In der Flora 1892 giebt R. H. Schmidt[1]) eine Nährlösung für Phycomyces an, die neben den allgemein verwendeten anorganischen Salzen 3% Traubenzucker enthält, und berichtet, dass er mit dieser gute Kulturen dieses Pilzes erzielt habe. Ich habe genau dieselbe Nährlösung bei Einhaltung der nämlichen Bedingungen bezüglich der Sterilisation, der Flüssigkeitsmenge u. s. w. benutzt, konnte aber stets nur einzelne spärliche, zwar recht grosse, aber bei Beginn der Sporenreife umknickende Fruchtträger erhalten. Die Verschiedenheit der Resultate kann ich nur durch die verschiedene Reinheit der verwendeten Präparate erklären, wie ich überhaupt Gelegenheit hatte, während meiner Arbeiten zu beobachten, dass gewöhnlichere Marken organischer

1) Über Aufnahme und Verarbeitung von fetten Ölen durch Pflanzen.

Präparate den Pilzen mehr zusagten, als die mit aller Sorgfalt gereinigten.

Auch die Entwicklung von Thamnidium elegans in den versuchten Nährlösungen, die Rohrzucker, Traubenzucker, Asparagin, Leucin oder Glycerin als Kohlenstoffquelle enthielten, war zu gering, um mit diesem interessanten Pilze ein für diese Arbeit hinreichendes Resultat erzielen zu können. Nachdem sich in 3—5 Tagen ein gutes Mycel in der Flüssigkeit gebildet hatte, kam an irgend einer Stelle auf der Flüssigkeit ein 1—5 □mm grosser Rasen hervor, der einige Fruchtträger entwickelte. Die Kultur nahm dann teils gar nicht, teils sehr langsam zu, manchmal vergrösserte sich dieser Rasen, andere Male aber entstanden neue an anderen Stellen. Verschiedene Konzentrationen der organischen Stoffe bewirkten keine augenfällige Änderung. Nach den Untersuchungen Bachmanns[1]) wirken auf Thamnidium elegans vorwiegend stickstoffhaltige Substrate in anderer Weise ein, als Kohlenhydrate, indem die ersteren neben den Endsporangien dieser Murorinee die dichotom verzweigten Seitenäste mit kleinen Sporangiolen veranlassen, während die an Kohlenhydraten reichen Substrate dahin wirken, dass die Sporangiolen grösser werden und an weniger verzweigten Seitenästen sitzen. Auf Grund dieser Arbeit entschloss ich mich zu Versuchen mit Pepton. Dieses änderte auch das Bild in einer mir sehr willkommenen Weise, indem sich das Mycel zum grössten Teil am oberen Rande der Flüssigkeit bildete; es entstand in der Regel vom Rande

1) Bot. Ztg. 1895. Einfluss der äusseren Bedingungen auf die Sporenbildung von Thamnidium elegans.

des Gefässes aus die Fruktifikation, die auch einige Male bis zur Mitte hin fortschritt. Jedoch blieb das Wachstum unverändert z. B. bei verschiedenem Gehalt an Chlorkalium. Ich versuchte verschiedene Peptone des Handels und fand, dass gerade die billigsten, unreinsten, viel Pepsin haltigen Marken das Wachstum des Pilzes am günstigsten beeinflussten. Leider enthielten sämtliche Peptone relativ viel Asche, die natürlich für die vorliegende Arbeit am meisten stört und keine exakten Resultate zulässt.

So blieben mir also nur noch Mucor corymbifer und Rhizopus nigricans, zu denen sich noch gegen Ende der Arbeit Botrytis cinerea, das ich im Kalthaus des botanischen Gartens auf einem Stengel von Delphinium Staphisagria fand, gesellte.

Zu den vorliegenden Untersuchungen, bei denen selbstverständlich nur Reinkulturen zu Vergleichen herangezogen wurden, eignet sich vor allem Rhizopus nigricans, da er bei raschem Wachstum durch Bildung von Luftmycel und schwarzen Sporangien deutliche Grenzen in seiner Entwicklung bietet und sein Erntegewicht das der übrigen Spezies in verhältnismässig kurzer Zeit übertrifft; er ist deshalb auch am besten durchgearbeitet worden. Rhizopus sowie Botrytis wurden bei Zimmertemperatur in zerstreutem Tageslicht, der pathogene Mucor corymbiser der im Körper von Kaninchen eine tötliche Mykose hervorruft, dagegen bei Bluttemperatur im Thermostaten gezüchtet.

Spezieller Teil.

Bis jetzt haben wir nur beschränkte Erfahrungen über die Verbindungen, welche zur Nahrung der Pilze dienen, noch weniger über deren Umlagerungen im lebenden Organismus und über die Rolle, welche sie im Stoffwechsel der Pilze erfahren. Dass chlorophyllfreie Pflanzen thatsächlich organischer, also kohlenstoffhaltiger Stoffe benötigen, bedarf wohl keines besonderen Beweises mehr; ebenso fest steht die Thatsache, dass für jeden vegetabilischen Organismus Stickstoffnahrung unentbehrlich ist, da der Aufbau des lebendigen Zellkomplexes nicht ohne Stickstoffverbindungen möglich ist. Für Pilze hat Pasteur[1]) den exakten Beweis geliefert. Anders steht es jedoch mit den Aschenbestandteilen der Pilze. Allgemein gibt man heute zu einer Pilznährlösung eine Phosphor-, eine Schwefel-, eine Magnesium- und eine Kaliumverbindung. Da, wie wir in der Einleitung gesehen haben, eine teilweise oder völlige Vertretung einzelner Elementarstoffe von einigen Autoren für möglich gehalten wird, habe ich mir für die vorliegende Arbeit folgende Fragen gestellt: Sind 1. Kalium-, 2. Magnesium-, 3. Schwefel- und 4. Phosphorverbindungen zum normalen Gedeihen der Pilze nötig, oder kann die eine oder andere der Verbindungen durch chemisch verwandte Stoffe vertreten werden?

---

1) Annal. d. chim. et phys. 1862 III ser. Bd. 64 p. 106.

I. Sind Kaliumverbindungen als Nahrung für Pilze immer notwendig oder sind dieselben durch Verbindungen anderer verwandter Elemente zu ersetzen?

Das Kalium ist bis jetzt noch in keiner Pflanzenasche vermisst worden und es ist nachgewiesen, dass die Chlorophyllpflanzen desselben unbedingt bedürfen. Es liegt daher der Gedanke nahe, dass auch Pilze ohne Kaliumverbindungen nicht gedeihen können, zumal da man dem Kaliumsalz nicht eine bestimmte einzelne Funktion im Pflanzenorganismus, sondern eine Beteiligung bei der Bildung des Protoplasmas in jeder Zelle zuschreibt. Doch behaupteten, wie schon erwähnt, Nägeli und Löw (1879), dass Kalium vorteilhaft durch Rubidium und Cäsium ersetzt werden könne. Die genannten Forscher arbeiteten mit Penicillium, Hefe und Bakterien. Nägeli schreibt über die bei seinen Versuchen gewonnenen Resultate: „Das Kalium kann nicht durch Natrium, Lithium, Baryum, Strontium, Calcium, Magnesium oder Ammonium ersetzt werden, wohl aber durch Rubidium und Cäsium. Salze der beiden letzten Elemente ernähren den Pilz ebensogut, wo nicht besser als Kaliumsalze.“ Winogradsky[1]) konstatierte dann 1884 für den Kahmpilz gleichfalls die Vertretbarkeit von Kalium durch Rubidium. Cäsium und Lithium erwiesen sich nach seinen Versuchen als untauglich. Beneckes Urteil ist folgendes: „Die Gegenwart des Kaliums ist schlechterdings notwendig; ohne dieses Metall tritt keine, oder richtiger nur spurenweise Keimung ein. Natrium und Lithium sind schlechter-

1) Ref. in d. bot. Centralbl. XX p. 165. Über die Wirkung äusserer Einflüsse auf die Entwickl. v. Mycoderma vini.

dings untauglich, auch von einer teilweisen Vertretbarkeit durch sie ist nichts zu bemerken. Das Rubidium kann zwar das Kalium nicht ganz, wohl aber zum Teil vertreten, insofern es Mycelbildung aber keine Sporenbildung erlaubt. Cäsium schliesst sich dem Rubidium an.“ Wehmer endlich erhält die Verarbeitung der Natriumsalze an Stelle der Kaliumsalze durch den Pilz aufrecht.

Ich komme nun zu meinen eigenen Versuchen. Als ersten Orientierungsversuch setzte ich den in Tabelle I angeführten an. Hierzu bemerke ich,dass mir eine einzelne Versuchsreihe nicht massgebend war, und dass ich das Durchschnittsgewicht dreier analoger Kultureihen angeführt habe. Eine Aufzählung und eingehende Besprechung aller Versuche, von denen einige Hundert allein mit Rhizopus angestellt wurden, würde eine zwecklose Ausdehnung der Arbeit sein und begnüge ich mich deshalb mit der Anführung der besten Kulturreihen. Unter „makroskopisch sichtbarer Keimung“ verstehe ich die Erscheinung, dass auf der Oberfläche der Flüssigkeit oder doch am Rande des Gefässes ein matter Anflug erschien. War dies nicht der Fall, so habe ich in die bezügliche Rubrik die Bemerkung gemacht: „Flüssigkeit trüb“ oder „Mycel in der Flüssigkeit“. Die erstere soll bedeuten, dass wohl die Spore mikroskopisch sichtbar ausgekeimt, nicht aber über einen sehr kurzen Keimschlauch gediehen ist, während durch die zweite ein mit unbewaffnetem Auge sichtbares meist zusammenhängendes Mycel, das aber nicht das Flüssigkeitsniveau erreicht hat, bezeichnet werden soll. Kommt der Mycelrasen über die Flüssigkeit, ohne jedoch zu fruktificieren, so bezeichne

ich diesen Zustand als steril, (auch die weissen Sporangien von Rhizopus zähle ich noch hierher), und fertil ist die Pilzmasse, wenn deutlich Sporen zu erkennen sind, gleichgültig ob bei Rhizopus Luftmycel vorhanden ist, oder nicht. Bei den Versuchen mit Mucor corymbifer konnte ich die beiden letzten Wachstumsphasen nicht trennen, da die farblosen Sporen nicht, wie bei den meisten Schimmelpilzen, an aufrechten Fruchtträgern stehen, sondern diese niedergebeugt längs des Substrates wachsen und so vom übrigen Luftmycel sehr verdeckt werden, so dass eine sterile von einer fertilen Kultur mit blossem Auge nicht zu unterscheiden ist; ich musste mich deshalb bei diesem Pilze auf die Anführung des Erntegewichtes beschränken.

Umstehende Tabelle I zeigt die Anordnung des Versuches mit Rhizopus nigricans. Es wurde also eine kaliumfreie Nährlösung 1. mit 0,01 % Chlorkalium oder diesem äquivalenten Mengen von Chlorlithium, Chlornatrium, Kupferchlorid, Rubidiumchlorid und Cäsiumchlorid und 2. mit 0,001 % Chlorkalium und diesem äquivalenten Mengen derselben Salze beschickt und die Entwicklung der eingeimpften Rhizopussporen verfolgt. Äquivalente Mengen der Salze wandte ich an, weil ich bald die Beobachtung machte, dass Lösungen verschiedener Substanzen von gleicher Konzentration keine völlige Übereinstimmung zeigten und dass die in gewichtsprozentischen Verhältnissen angewendeten Säuren derselben Basen ungleiches Wachstum hervorriefen. In Pringsheims Jahrbüchern 1884 findet sich eine Abhandlung von H. de Vries[1]), worin

1) Über isotonische Coefficienten.

der Verfasser klarlegt, dass die plasmolytischen Wirkungen verschiedener Substanzen auf Pflanzenzellen dann im einfachsten Verhältnis stehen, wenn die Lösungen mit äquimolekularen Mengen hergestellt werden. Ich bin in dieser Hinsicht genanntem Autor gefolgt und noch einen Schritt weiter gegangen, weil ich zum Teil verschiedenartige Elemente zu vergleichen hatte, indem ich die Lösungen nicht in äquimolekularen sondern äquivalenten Gewichtsmengen bereitete.

Aus der Tabelle geht hervor, dass ausser Kaliumsalzen nur die des Natriums noch wägbare Pilzmassen lieferten. Mit Natriumchlorid erzielte ich stets nur steriles Mycel, mit Ausnahme eines Falles mit 0,0077 % Zusatz, indem dort 2 Fruchtträger auftraten. Das Gewicht betrug 0,0042 gr (Mittel von drei Kulturen). Berücksichtigt man hiergegen das Erntegewicht des mit Kaliumsalz erzielten Pilzes, so steht das erstere um fast das vierzigfache zurück. Die Sporen in den mit Lithium-, Kupfer-, Rubidium- und Cäsiumchlorid beschickten Kulturkolben hatten nicht einmal die makroskopisch sichtbare Keimung erreicht. Gleiche Resultate ergaben die Versuche mit Mucor corymbifer und Botrytis cinerca, nur dass die Erntegewichte nicht so stark differierten. Mit ersterer Mucorinee betrug das mit 0,01 % Chlorkalium erzielte Gewicht 0,105, dagegen das mit Chlornatrium 0,035, mit Botrytis 0,07 mit Chlorkalium, 0,006 mit Chlornatrium, beide nach 7 Tagen in sonst gleicher Nährlösung. Ich schloss aus diesen ersten Versuchen, dass nur eventuell das Natriumsalz die Funktionen des Kaliumsalzes bei der Ernährung der Pilze teilweise übernehmen könnte. Bevor ich jedoch an diese Frage herantrat, unterwarf ich die Kaliumsalze der Schwefel-, Salz- und Salpeter-

Tab. I. **Rhizopus nigricans.**

Nährlösung: Rohrzucker 2,5 %, Chlorammonium 0,25 %, schwefelsaures Magnesium 0,025 %, primäres phosphorsaures Ammonium 0,025 %, Eisenchlorid Spur.

No.	Flüssigkeits-Volumen cbcm	Zusatz in %	Makroskopisch sichtbare Keimung nach Tagen	Mycel steril nach Tagen	Mycel fertil nach Tagen	Trockengewicht nach 10 Tagen	Bemerkung.
1	40	KCl 0,01	2	3	4	0,161	
2	40	LiCl 0,0057	4 (etwas Mycel in der Flüssigkeit)	—	—	—	
3	40	NaCl 0,0077	2	4	5 2 Fruchtträger	0,0042	
4	40	$CuCl_2$ 0,0089	7 (etwas Mycel in der Flüssigkeit)	—	—	—	
5	40	RbCl 0,0161	5 „	—	—	—	
6	40	CsCl 0,026	5 „		—	—	
7	40	KCl 0,001	2	3	4	—	
8	40	LiCl 0,00057	4 (etwas Mycel in der Flüssigkeit)	—	—	0,132	
9	40	NaCl 0,00077	2	4 crc. 20 Fäden	—	0,0005	
10	40	$CuCl_2$ 0,00089	6 (etwas Mycel in der Flüssigkeit)	—	—	—	
11	40	RbCl 0,00161	4 „	—	—	—	
12	40	CsCl 0,0026	4 „	—	—	—	

säure einem genaueren Studium, um zu erfahren, ob vielleicht das Kalium in Verbindung mit diesen drei Säuren Verschiedenheiten in ernährungsphysiologischen Beziehungen zeigt.

1. Kaliumsalze.

Tabelle II a zeigt die Versuchsanordnung mit Rhizopus nigricans. Danach verhalten sich also die drei Kaliumsalze, in äquivalenten Mengen der Nährlösung zugesetzt, ganz gleich; bei Wiederholungen des Versuches traten oft geringe Schwankungen der Erntegewichte auf, bald ergab schwefelsaures, bald Chlorkalium eine um ein Geringes bessere Ernte. Im grossen und ganzen jedoch erwiesen sich die Salze als gleich gute Ernährer, so dass ich die minimalen Schwankungen äusseren Einflüssen zuschreiben muss. Man sieht ferner aus der Tabelle, dass ein reichliches Düngen mit Schwefel durch die Schwefelsäure gegenüber der nicht nährenden Salzsäure ohne Einfluss ist. Sofort in die Augen fallend sind die Nr. 6, 13 und 19. Sonach wird von Rhizopus ein Gehalt von $^1/_{100}$ mgr Kaliumsalz noch deutlich empfunden. Tabelle II b zeigt uns für Mucor corymbifer den bemerkbaren Einfluss des Kaliumsalzes bei $^1/_{20}$ mgr; bei $^1/_{40}$ mgr fand ich die Grenze für Botrytis cinerea bei gleicher Versuchsansetzung. Diese enorm niedrigen Zahlen lassen erkennen, welche Sorgfalt man auf die Reinheit der Salze zu verwenden hat, um ein einigermassen exaktes Resultat zu erzielen; ebenso zeigen die Tabellen, dass noch lange nicht der gewünschte Grad der Reinheit aller Substanzen erreicht ist, denn selbst ohne Kaliumsalzzugabe habe ich bei allen drei Mucorieen ein Auskeimen erhalten. Diese geringe

Tab. II a.

Rhizopus nigricans.

Nährlösung: Rohrzucker 2,5 %, Chlorammonium 0,25 %, schwefelsaures Magnesium 0,025 %, primäres phosphorsaures Ammonium 0,025 %, Eisenchlorid Spur.

No.	Flüssigkeits-Volumen cbcm	Zusatz in %	Makroskopisch sichtbare Keimung nach Tagen	Mycel steril nach Tagen	Mycel fertil nach Tagen	Trockengewicht nach 7 Tagen	Bemerkung.
1	40	—	7 (etwas Mycel in der Flüssigkeit)	—	—	0,0013	
2	44	KCl 0,0000001	7 „	—	—	0,0012	
3	42	„ 0,0000005	7 „	—	—	0,005	
4	44	„ 0,000001	7 „	—	—	0,002	
5	42	„ 0,000005	4	—	—	0,0045	Die Differenz im Flüssigkeits-Volumen rührt daher, dass ich mich bei den minimalen Mengen der zur Nährlösung zuzusetzenden Salze einer Lösung von 0,1 KCl (respektive äquivalente KNO_3 und K_2SO_4) zu 100,0 Wasser bediente, die sich dann leicht immer stärker verdünnen liess und von der ich dann 4 oder 2 cbcm zusetzte.
6	44	„ 0,00001	4	5	6 wenig Fruchtträger	0,087	
7	42	„ 0,00005	4	5	6 „	0,0858	
8	44	„ 0,0001	3	$4^1/_2$	5	0,12	
9	44	„ 0,001	2	3	4	0,156	
10	40	„ 0,01	2	3	4	0,162	
11	44	KNO_3 0,00000135	7 (etwas Mycel in der Flüssigkeit)	—	—	0,003	
12	42	„ 0,0000067	7 „	—	—	0,0042	
13	44	„ 0,0000135	3	4	5	0,062	
14	44	„ 0,000135	2	3	4	0,091	
15	44	„ 0,00135	2	3	4	0,121	
16	40	„ 0,0135	2	3	4	0,18	
17	44	K_2SO_4 0,00000117	7 (Mycel in der Flüssigkeit)	—	—	0,0041	
18	42	„ 0,0000058	7 „	—	—	0,0042	
19	44	„ 0,0000117	3	4	$5^1/_2$	0,057	
20	44	„ 0,000117	2	3	4	0,107	
21	44	„ 0,00117	2	3	4	0,160	
22	40	„ 0,0117	2	3	4	0,125	

Tab. II b. **Mucor corymbifer.**

Nährlösung: Rohrzucker 2,5 %, Chlorammonium 0,25 %, schwefelsaures Magnesium 0,025 %, primäres phosphorsaures Ammonium 0,025 %, Eisenchlorid Spur.

No.	Flüssigkeits-Volumen cbcm	Zusatz in %		Makroskopisch sichtbare Keimung nach Tagen		Pilzmasse oberhalb d. Flüssigkeit nach Tagen	Trockengewicht nach 7 Tagen
1	40	—		7	(Mycel in der Flüssigkeit)	—	0,002
2	44	KCl	0,0000001	7	„	—	0,007
3	42	„	0,0000005	7	„	—	0,008
4	44	„	0,000001	7	„	—	0,005
5	42	„	0,000005	7	„	—	0,007
6	44	„	0,00001	7	„	—	0,014
7	42	„	0,00005		2	3	0,087
8	44	„	0,0001		2	3	0,085
9	44	„	0,001		2	3	0,126
10	40	„	0,01		2	3	0,099
11	40	„	0,1		2	3	0,098
12	40	„	0,2		2	3	0,097
13	40	„	0,5		2	3	0,085
14	44	NNO_3	0,00000135	7	(Mycel in der Flüssigkeit	—	0,009
15	42	„	0,0000067	7	„	—	0,01
16	44	„	0,0000135	7	„	—	0,009
17	42	„	0,000067		2	3	0,083
18	44	„	0,000135		2	3	0,072
19	44	„	0,00135		2	3	0,098
20	40	„	0,0135		2	3	0,102
21	40	„	0,135		2	3	0,097
22	44	K_2SO_4	0,00000117	7	(Mycel in der Flüssigkeit)	—	0,009
23	42	„	0,0000058	7	„	—	0,012
24	44	„	0,0000117		3	—	0,022
25	42	„	0,000058		2	3	0,088
26	44	„	0,000117		2	3	0,091
27	44	„	0,00117		2	3	0,130
28	40	„	0,0117		2	3	0,121
29	40	„	0,117		2	3	0,098

Mycelmasse fruktifizierte in allen Fällen schon nach zwei Tagen auf Zusatz von 0,01 % Kaliumsalz, während sie sich ohne Kaliumsalzzugabe auch nach 4 Wochen nicht sichtbar veränderte. Das Optimum an Kaliumsalzgehalt aus den Tabellen zu entnehmen ist schwer; es dürfte nach anderen speziell hierüber angestellten Versuchen zwischen 0,003 u. 0,05 bei allen drei untersuchten Pilzspezies liegen. Ein grösserer Kaliumsalzgehalt ruft keine äusserlich sichtbare Vermehrung der Pilzmasse hervor und eine starke Kaliumsalzdüngung ist sogar schädlich. Das Maximum an Kaliumverbindungen, welches von Rhizopus, um fruktifizieren zu können, ertragen wird, liegt für Chlorkalium bei 7,5 % und für salpetersaures Kalium bei 7 %; schwefelsaures Kalium löst sich nur bis zu 10 % und in dieser Lösung gedeiht Rhizopus noch sehr gut.

2. Natriumsalze.

Ich komme jetzt zur Besprechung der Natriumsalze und legte mir zunächst die Frage vor: Haben Natriumverbindungen in kaliumsalzhaltigen Nährlösungen fördernde oder hemmende Wirkung? Wie aus Tabelle III zu ersehen ist, lautet die Antwort: Es trifft keiner der beiden möglichen Fälle zu; der Pilz gedeiht ohne Natriumsalz ebensogut als bei Vorhandensein desselben, und ebensowenig benachteiligen Natriumsalze das Wachstum desselben. Mit blossem Auge war absolut kein Unterschied in der Entwicklung bei verschiedenem Gehalt an Natriumsalz zu bemerken und auch das Erntegewicht ist mit geringen Schwankungen um 0,15 gr konstant zu nennen. Das-

Tab. III. **Rhizopus nigricans.**

Nährlösung: Rohrzucker 2,5 %, Chlorammonium 0,25, schwefelsaures Magnesium 0,025 %, primäres phosphorsaures Kalium 0,025 %, Eisenchlorid Spur.

No.	Flüssigkeits-Volumen cbcm	Zusatz in %	Makroskopisch sichtbare Keimung nach Tagen	Mycel steril nach Tagen	Mycel fertil nach Tagen	Trockengewicht nach 6 Tagen	Bemerkung.
1	50	—	2	3	4	0,149	
2	55	NaCl 0,000001	2	3	4	0,152	
3	52,5	„ 0,000005	2	3	4	0,148	
4	55	„ 0,00001	2	3	4	0,151	
5	52,5	„ 0,00005	2	3	4	0,148	
6	55	„ 0,0001	—	verunglückt	—	—	
7	52,5	„ 0,0005	2	3	4	0,151	
8	55	„ 0,001	2	3	4	0,18	
9	50	„ 0,01	2	3	4	0,16	
10	50	„ 0,1	2	3	4	0,149	
11	55	$NaNO_3$ 0,000148	2	3	4	0,159	
12	55	„ 0,00148	2	3	4	0,149	
13	50	„ 0,0148	2	3	4	0,1395	
14	50	„ 0,148	2	3	4	0,141	
15	55	Na_2SO_4 0,00028	2	3	4	0,160	
16	55	„ 0,0028	2	3	4	0,151	

selbe Resultat ergaben Versuche mit Mucor corymbifer und Botrytis cinerea. Was das Maximum der von Rhizopus ertragenen Natriumsalze anlangt, so erzielte ich schwache aber noch fruktifizierende Pilzmassen bei 12% Chlornatrium und 26% schwefelsaurem Natrium ($+ 10H_2O$), während der Pilz mit 6% salpetersaurem Natrium nur noch sehr schwach und mit Unterdrückung des Luftmycels fruktifizierte.

Die Lösung der zweiten Frage, die in der vorliegenden Arbeit in Betracht kommt, nämlich ob Natriumsalze ganz oder teilweise die Funktionen der Kaliumsalze bei der Ernährung der Pilze übernehmen können, ging nicht so glatt von statten und ich bedurfte mehrfacher Wiederholungen und Variierungen, bis ich zu der Ansicht kam, dass das geringe Wachstum nur durch Verunreinigung kommen könne. Mit Rohrzucker und den anorganischen Nährsalzen erhielt ich bei Natriumsalzzusatz stets eine sichtbare Mycelbildung, ja bei Zusatz von viel Natriumsalz (s. Tab. IV) sogar Luftmycel und einzelne Fruchtträger. Unter denselben Bedingungen gestaltete sich das Wachstum von Mucor corymbifer folgendermassen: Mit Ausnahme des Glases ohne Natriumsalz erschien zunächst bei allen Kulturen eine makroskopisch sichtbare Keimung nach 2 Tagen. Am folgenden Tage jedoch war das ganze Mycel wieder untergetaucht und kam in der Folge nie mehr hervor. Das Durchschnittsgewicht betrug 0,003 gr. Mit Glycerin als organischem Nährstoff erzielte ich nicht die geringste makroskopisch sichtbare Mycelbildung in oder ausserhalb der Flüssigkeit ausser bei Zusatz von 0,28% schwefelsaurem Natrium, wo zunächst nach acht Tagen — wie spon-

Tab. IV.

Rhizopus nigricans.

Nährlösung: Rohrzucker 2,5 %, Chlorammonium 0,25 %, schwefelsaures Magnesium 0,025 %, primäres phosphorsaures Ammonium 0,025 %, Eisenchlorid Spur.

No.	Flüssigkeits-Volumen cbcm	Zusatz in %	Makroskopisch sichtbare Keimung nach Tagen	Mycel steril nach Tagen	Mycel fertil nach Tagen	Trockengewicht nach 9 Tagen	Bemerkung.
1	40	—	4 (etwas Mycel in der Flüssigkeit)	—	—	—	
2	44	NaCl 0,00001	4 „	—	—	—	
3	44	„ 0,0001	4 „	—	—	—	
4	44	„ 0,001	3	—	—	—	
5	40	„ 0,01	2	3	—	0,032	
6	40	„ 0,1	3	4 sehr wenig	6 12 kurze Fruchtträger	0,012	
7	44	$NaNO_3$ 0,0000148	4 (Flüssigkeit trüb)	—	—	—	
8	44	„ 0,000148	4 „	—	—	—	
9	44	„ 0,00148	4 (Mycel in der Flüssigkeit)	—	—	—	
10	40	„ 0,0148	3	4 sehr wenig	—	—	
11	40	„ 0,148	3	4 „	6 2 Fruchtträger	0,004	
12	44	Na_2SO_4 0,000028	4 (Flüssigkeit trüb)	—	—	—	
13	44	„ 0,00028	4 (etwas Mycel in der Flüssigkeit)	—	—	—	
14	44	„ 0,0028	4 „	—	—	—	
15	40	„ 0,028	3	—	—	—	
16	40	„ 0,28	3	4 sehr wenig	6 einzelne Fruchtträger an der Wand d. Glases	0,005	

tan — ein kurzer Fruchtträger direkt aus der Flüssigkeit herausragte und erst nach 4 weiteren Tagen Luftmycel erschien, das sich langsam aber sichtbar vermehrte. Das Gewicht dieser 15 Tage alten Kultur betrug 0,0052 gr.

Es erübrigt hier noch die Besprechung von Glycerin Kulturen überhaupt gegenüber Zuckerkulturen. Die Sporen von Rhizopus keimen in Glycerin mit den gewöhnlichen anorganischen Salzen versetzten Lösungen kaum sichtbar aus, sie bilden ein ganz zartes wenig verzweigtes Mycel in der Flüssigkeit, das stets zuerst kurze Sporenträger mit völlig normal ausgebildeten Sporen erzeugt. Erst einige Tage später, manchmal eine ganze Woche später entsteht das Luftmycel, das in Zuckerkulturen wohl die Hauptmasse des Pilzgewichtes ausmacht.

Die Natriumsalze hatte ich besonders für diese Arbeit kaliumfrei herstellen lassen und konnte auch weder mikrochemisch noch spektroskopisch eine Verunreinigung mit Kalium nachweisen. Trotzdem glaube ich doch an eine solche, weil ein relativ starkes Wachstum immer erst bei bedeutenderem Natriumsalzzusatz eintrat und bereits eine so geringe Menge K.salz (wie Tab. I a zeigt $^1/_{100}$ mgr) genügt, eine bedeutend stärkere Kultur zu erzeugen, als ich in Natriumkulturen überhaupt erhalten habe. Diese Ansicht wurde mir weiter bestätigt durch einen Versuch, den ich erwähnen will, weil daraus ersichtlich ist, mit welcher Accuratesse derartige Arbeiten ausgeführt werden müssen, sollen sie nicht zu falschen Schlüssen Veranlassung geben. Zur bequemeren Handhabung stellte ich mir anfangs Lösungen von Salzen her, die

ich teilweise, so z. B. bei Natriumsalzen, vorrätig hielt. Eines Tages kam ich auf den Gedanken, es könne sich wohl irgend ein Bestandteil des Glases den nie erwärmten Lösungen mitgeteilt haben. Um dies zu ermitteln, setzte ich analoge Kulturen an 1. aus frisch bereiteten und 2. aus 14 Tage in Lösung vorrätigen Natriumsalzen mit den entsprechenden anorganischen Nährsalzen, jedoch ohne Kaliumsalz, und mit 2,5 % Rohrzucker in Jenaer Geräteglaskolben. Der Unterschied war enorm! Schon nach vier Tagen hatten die Kulturen der zweiten Reihe fast gleichmässig viel Sporangien, während die frisch bereiteten kaum Mycel in der Flüssigkeit aufwiesen. Ich habe den Versuch nicht quantitativ verwertet, weil schon mit blossem Auge zu erkennen war, dass hier die zweite Reihe der Kulturgefässe durch gleichviel Kalium, das aus der Wand des als Aufbewahrungsgefäss der vorrätigen Lösung dienenden Glases stammte, verunreinigt war.

Es stimmt also mein Resultat über Kalium und Natriumsalze überein mit den Befunden von Benecke und ich bin mit ihm der Ansicht, dass das geringe Wachstum in natriumsalzhaltigen Kulturen nur durch Verunreinigungen mit Kaliumsalzen hervorgerufen wird.

Von den nun folgenden Kupfer-, Lithium-, Cäsium- und Rubidiumsalzen wissen wir bereits aus Tabelle I, dass sie nicht im stande sind, die Kaliumsalze zu ersetzen; wir haben infolge dessen hier nur auf ihre Wirkung in vollständigen guten Nährlösungen einzugehen.

3. Kupfersalze.

Die Kupferverbindungen werden seit längerer Zeit als Gegenmittel gegen die den Kulturpflanzen schäd-

lichen parasitischen Pilze angewendet; besonders das schwefelsaure Kupfer benutzt wohl jeder Landwirt heute als Samenbeize speziell beim Weizen, um die Entwicklung des Getreidebrandes zu verhüten, dessen Sporen in einer Lösung dieses Salzes getötet werden. Natürlich ist dabei die Konzentration der Kupfervitriollösung zu berücksichtigen, da sonst leicht die Keimfähigkeit der Weizenkörner beeinträchtigt wird. Neuerdings hat ein Kupferpräparat grosse Bedeutung erlangt, nämlich die Kupfervitriolkalkbrühe — buille bordelaise — womit man die grünen Blätter besonders des Weinstockes und der Kartoffeln bespritzt, um diese Pflanzen vor den ihnen gefährlichen Peronosporaceen zu schützen. Dabei hat man ausserdem den günstigen Erfolg gehabt, dass das Kupfer in diesem Falle wie ein Reizmittel auf Chlorophyllpflanzen wirkt, wodurch deren Lebensthätigkeit erhöht wird. Den Einfluss des Kupfersulfates auf das Wachstum des Rhizopus zeigt Tabelle V a. Wir finden, dass sich der Pilz in einer vollständigen Nährlösung mit weniger als $^1/_{100}$ mgr Kupfersulfat genau so schnell entwickelt, als ohne dieses Salz, dass er es jedoch in dieser Zeit zu höherem Erntegewicht bringt, während stärkere Zusätze bis 0,05 % die Keimung mit zunehmender Stärke immer mehr hemmen und das Gewicht erniedrigen. Oberhalb dieser Grenze hört das Wachstum ganz auf. Auch Mucor corymbifer (Tab. V b) wird von Kupfersulfat genau so beeinflusst. Die Grenzzahlen sind ungefähr die Gleichen, und Botrytis cinerea schliesst sich ebenfalls an (Tab. V c). Wir können also aus den Tabellen den Einfluss des Kupfers als Reizmittel für chlorophyllose Pflanzen ebenso wieder-

Tab. Va.

Rhizopus nigricans.

Nährlösung: Rohrzucker 2,5%, Chlorammonium 0,25%, schwefelsaures Magnesium 0,025%, primäres phosphorsaures Kalium 0,025%, Eisenchlorid Spur.

No.	Flüssigkeits-Volumen cbcm	Zusatz in %	Makroskopisch sichtbare Keimung nach Tagen	Mycel steril nach Tagen	Mycel fertil nach Tagen	Trockengewicht nach 14 Tagen	Bemerkung.
1	55	$CuSO_4$ 0,0000001	2	3	4	0,196	
2	52,5	„ 0,0000005	2	3	4	0,188	
3	55	„ 0,000001	2	3	4	0,198	
4	52,5	„ 0,000005	2	3	4	0,21	
5	55	„ 0,00001	2	3	4	0,202	
6	52,5	„ 0,00005	2	4	5	0,153	
7	55	„ 0,0001	4	5	6	0,14	
8	52,5	„ 0,0005	4	6	7	0,153	
9	55	„ 0,001	6	7	8	0,15	
10	52,5	„ 0,005	7	7	8	0,102	
11	50	„ 0,01	7	8	8	0,08	
12	50	„ 0,05	8	10	14	0,066	
13	50	„ 0,1	—	—	—	—	
14	50	„ 0,1	—	—	—	—	
15	50	„ 0,5	—	—	—	—	
16	50	—	2	3	4	0,191	

Tab. V b. **Mucor corymbifer.**

Nährlösung: Rohrzucker 2,5 %, Chlorammonium 0,25 %, schwefelsaures Magnesium 0,025 %, Eisenchlorid Spur, primäres phosphorsaures Kalium 0,025 %.

No.	Flüssigkeits-Volumen cbcm	Zusatz in %	Makroskopisch sichtbare Keimung nach Tagen	Mycel oberhalb der Flüssigkeit nach Tagen	Trockengewicht nach Tagen
1	50	—	3	4	0,089
2	55	$CuSO_4$ 0,0000001	3	5	0,132
3	52,5	„ 0,0000005	3	5	0,111
4	55	„ 0,000001	3	5	0,121
5	52,5	„ 0,000005	3	5	0,113
6	55	„ 0,00001	3	5	0,124
7	52,5	„ 0,00005	3	5	?
8	55	„ 0,0001	3	6	0,121
9	52,5	„ 0,0005	4	6	0,101
10	55	„ 0,001	5	7	0,082
11	52,5	„ 0,005	5	7	0,060
12	50	„ 0,01	5	7	0,062
13	50	„ 0,1	—	—	—
14	50	„ 0,2	—	—	—
15	50	„ 0,5	—	—	—
16	50	„ 1,0	—	—	—

Tab. V c. **Botrytis cinerea.**

Nährlösung: Rohrzucker 2,5 %, Chlorammonium 0,25 %, schwefelsaures Magnesium 0,025 %, Eisenchlorid Spur, primäres phosphorsaures Kalium 0,025 %.

No.	Flüssigkeits-Volumen cbcm	Zusatz in %	Makroskopisch sichtbare Keimung nach Tagen	Mycel oberhalb der Flüssigkeit nach Tagen	Trockengewicht nach Tagen
1	50	—	3	4	0,223
2	55	$CuSO_4$ 0,0000001	3	4	0,212
3	55	„ 0,000001	3	4	0,302
4	52,5	„ 0,000005	3	4	0,306
5	55	„ 0,00001	3	4	0,196
6	52,5	„ 0,00005	3	5	0.223
7	55	„ 0,0001	4	5	0,242
8	52,5	„ 0,0005	4	5	0,197
9	55	„ 0,001	5	—	0,006
10	50	„ 0,01	—	—	—
11	50	„ 0,1	—	—	—
12	50	„ 0,2	—	—	—
13	50	„ 0,5	—	—	—
14	50	„ 1,0	—	—	—

finden, wie wir ihn für grüne Pflanzen gesehen haben. Eine Ausnahme von der Empfindlichkeit durch Kupfersulfat scheint Penicillium glaucum zu machen; dieser Pilz wurde noch auf Substraten mit 9,5% Kupfersulfatzusatz gezogen und auch ich hatte Gelegenheit Penicillium in zuckerhaltiger 2% Kupfervitriollösung wachsen zu sehen.

4. Lithiumsalze.

Sowohl den grünen Pflanzen wie den Pilzen sind Lithiumsalze schädlich. Alle Forscher, die sich mit ernährungsphysiologischen Arbeiten beschäftigt und Lithiumsalze auf ihre Wirkung geprüft haben, konstatieren diese Thatsache. Auch mein Resultat mit Rhizopus stimmt mit den bisherigen Befunden überein; ich habe deshalb wohl nicht nötig, hier meinen Versuch eingehend anzuführen. Aus demselben Grunde sah ich davon ab, Mucor corymbifer und Botrytis cinerea in dieser Hinsicht zu prüfen. Die Grenze, bei der Rhizopus noch gedieh, fand ich bei 0,05% salpetersaurem Lithium; aber auch bedeutend niedrigere Zusätze dieses, wie des chlorwasserstoffsauren Salzes wirkten schon deutlich schädigend.

5. Rubidium- und Cäsiumsalze.

Die Salze dieser beiden Elemente fasse ich zusammen, weil ihre Wirkung als Nährstoffe für Pilze völlig identisch ist, wie ja auch schon Nägeli und Benecke diesen beiden Elementen gleiche ernährungsphysiologische Eigenschaften beilegen. Wie in der Einleitung und bei Besprechung der Kaliumsalze bereits erwähnt, hatten einige Forscher dem Rubidium und

Cäsium oder ersterer allein die Fähigkeit zugesprochen, das Kalium ganz oder teilweise vertreten zu können, und ich gehe deshalb auch hier noch einmal auf diese Frage genauer ein. Tabelle VI zeigt den Einfluss der Rubidium- und Cäsiumsalze auf kaliumsalzhaltige Nährlösung. Der Kontrolle halber sind unter Nr. 1—4 verschiedene Mengen Kaliumsalz der in uno hergestellten Nährlösung zugesetzt worden. Die Bedingungen, unter denen die 15 Kulturen wuchsen sind also in Bezug auf äussere Einflüsse völlig gleich. Wir erkennen aus den Erntegewichten, dass die Rubidium- und Cäsiumsalzhaltigen Ernten allerdings besser sind, als die der Kolben, welche nur Kaliumsalze allein enthalten. Es ist dies eine Bestätigung der Resultate von Benecke, dass nämlich Rubidium und Cäsium befähigt sind in guten Nährlösungen mehr Mycel zu bilden als Kaliumsalze allein.

Benecke erhielt nun aber auch ohne Zusatz von Kaliumsalz in Rubidium- oder Cäsiumsalz-Nährlösungen gleich schwere Kulturen wie in solchen mit Kaliumsalz ohne die beiden anderen Alkalien. Mit Rhizopus gelang mir dies auch in 3 Wochen alten Kulturen nie. Unter Tabelle VII führe ich einen eingehenden Versuch mit Rubidiumsalz an. — Die Resultate mit Cäsiumsalz sind identisch —, aus dem ersichtlich ist, dass Rubidium- resp. Cäsiumsalze in der als gut (aber nicht vollständig) zu bezeichnenden Nährlösung das Kaliumsalz nicht vertreten können, und dass das Erntegewicht ohne Kaliumsalzzusatz bedeutend geringer ist als in Kaliumkulturen; sehr selten sah ich bei retartiertem Luftmycel einige Sporenträger in einer Rubidiumkultur auftreten.

Tab. VI: **Rhizopus nigricans.**

Nährlösung: Rohrzucker 2,5 %, Chlorammonium 0,25 %, schwefelsaures Magnesium 0,025 %, primäres phosphorsaures Ammonium 0,025 %, Eisenchlorid Spur.

No.	Flüssigkeits-Volumen cbcm	Zusatz in %		Makroskopisch sichtbare Keimung nach Tagen	Mycel steril nach Tagen	Mycel fertil nach Tagen	Trockengewicht nach 7 Tagen	Bemerkung.
1	45	KCl	0,0001	2	3	4	0,095	Jenaer Gerätegläskolben.
2	45	„	0,001	2	3	4	0,14	
3	40	„	0,01	2	3	4	0,162	
4	40	„	0,1	2	3	4	0,155	
		Dieselbe Nährlösung + 0,01 % Chlorkalium.						
5	55	RbCl	0,00016	2	3	4	0,122	
6	55	„	0,0016	2	3	4	0,152	
7	55	„	0,016	2	3	4	0,173	
8	50	„	0,16	2	4	4½	0,145	
9	55	CsCl	0,000226	2	3	4	0,1585	
10	52,5	„	0,00113	2	3	4	0,156	Kolben aus gutem Kaliglas.
11	55	„	0,00226	2	3	4	0,162	
12	52,5	„	0,0113	2	3	4	0,168	
13	50	„	0,0226	2	3	4	0,168	
14	50	„	0,133	2	3	4	0,163	
15	50	„	0,226	2	4	4½	0,152	

Tab. VII. **Rhizopus nigricans.**

Nährlösung: Rohrzucker 2,5 %, Chlorammonium 0,25 %, schwefelsaures Magnesium 0,025 %, primäres phosphorsaures Ammonium 0,025, Eisenchlorid Spur.

No.	Flüssigkeits-Volumen cbcm	Zusatz in %		Makroskopisch sichtbare Keimung nach Tagen	Mycel steril nach Tagen	Mycel fertil nach Tagen	Trockengewicht nach 12 Tagen	Bemerkung.
1	45	RbCl	0,00001	6 (Mycel in der Flüssigkeit)	—	—	—	
2	45	„	0,0001	6 „	—	—		
3	45	„	0,001	6	7	—	0,082	
4	40	„	0,01	6 (Mycel in der Flüssigkeit)	—	—	—	
5	40	„	0,1	6 „	—	—	—	Das Gesamttrockengewicht der 13 Gläser, die nur Mycel in der Flüssigkeit aufzuweisen hatten, betrug 0,5928 gr, also im Mittel 0,0456.
6	45	$RbNO_3$	0,0000117	6 „	—	—	—	
7	45	„	0,000117	5 „	—	—	—	
8	45	„	0,00117	4	5	8 einige Fruchtträger	0,08	
9	40	„	0,0117	5 (Mycel in der Flüssigkeit)	—	—	—	
10	40	„	0,117	6 „	—	—	—	
11	45	Rb_2SO_4	0,0000112	6 „	—	—	—	
12	45	„	0,000112	6 „	—	—	—	
13	45	„	0,00112	5 „	—	—	—	
14	40	„	0,0112	5 „	—	—	—	
15	40	„	0,12	6 „		—	—	

Gleichzeitig habe ich auch das Verhalten von Rubidiumsalzen in Natriumsalzhaltigen Nährlösungen studiert und habe hierbei in 14 tägiger Kultur mit 0,001 % Rubidiumchlorid einige Fruchtträger erhalten. Der Versuch war Folgender:

Nährlösung wie in Tab. VII angegeben; je 40 cbcm in Jenaer Geräteglaskolben.

Nr.	1	NaCl	0,01 %	RbCl	0,1 %
„	2	„	„	„	0,01 %
„	3	„	„	„	0,001 %
„	4	„	„	„	0,0001 %
„	5	„	„	„	0,00001 %
„	6	„	„	CsCl	0,1 %
„	7	„	„	„	0,01 %
„	8	„	„	„	0,001 %
„	9	„	„	„	0,0001 %
„	10	„	„	„	0,00001 %
„	11	„	„		—

Am 5. Tage hatten Nr. 2, 3 6 und 7 kaum gekeimt, die übrigen Gläser sahen gleich aus, der Pilz hatte Mycel innerhalb der Flüssigkeit gebildet; es war also die Keimung um einen Tag früher eingetreten als ohne Natriumsalz. Nach 10 Tagen wiesen Nr. 4 und 8 etwas Luftmycel auf, bei dem man bei genauem Zusehen einige graue Sporenträger entdecken konnte. Ob hier das Natriumsalz helfend eingegriffen hat, oder diese Erscheinung zufällig war, lasse ich dahingestellt. Das Gewicht von Nr. 4 betrug 0,08, das von Nr. 8 0,052 nach 14 Tagen. Nr. 11 hatte sich seit dem 5. Tage nicht mehr verändert, während Nr. 1—3, 5—7 und 9 u. 10 sich etwas vermehrt hatten.

Als ich die ersten Versuche mit Rubidiumchlorid angestellt hatte und dabei zu anderen Resultaten gelangt war als Nägeli und Benecke, glaubte ich auf Grund der Ausführungen des letztgenannten Autors, dass ich zufällig ein wirklich reines (kaliumfreies) Rubidiumsalz erhalten hätte und liess mir deshalb der Kontrolle halber verschiedene Salze des Rubidiums von Merck, dessen Präparat Benecke bei seiner Arbeit benutzt hatte, kommen. Aber auch mit diesen Salzen erhielt ich mit Rhizopus das gleiche Resultat. Viele und sehr verschiedene Kulturen habe ich mit Mucor corymbifer über die Einwirkung von Rubidium- und Cäsiumsalzen angestellt, bin jedoch zu keinem einheitlichen Resultat bei dieser Mucoriee gelangt; ich verzichte deshalb auf Mitteilung der angestellten Versuche. Kulturen mit Botrytis cinerea in gleicher Nährlösung, wie in Tab. VII angegeben, ergaben ungefähr gleiche Erntegewichte mit Rubidium- und Kaliumsalz. Ich lasse einen Versuch hier folgen, je 40 cbm Nährlösung in Jenaer Geräteglaskolben.

Nr. 1	0,15%	Rb_2SO_2	Nr. 5	0,1%	K_2SO_4
„ 2	0,015	„	„ 6	0,01	„
„ 3	0,0015	„	„ 7	0,001	„
„ 4	0,00015	„	„ 8	0,0001	„

Nach 14 Tagen war der Anblick der Kulturreihe folgender: Alle Rubidiumkulturen hatten nur steriles Mycel gebildet mit Ausnahme von Nr. 1, welches einige Sporenträger aufwies. Die Kaliumkulturen waren sämtlich fertil. Die Trockengewichte betrugen: Nr. 1 0,09, Nr. 2 0,102, Nr. 3 0,07, Nr. 4 0,009, Nr. 5 0,101, Nr. 6 0,111, Nr. 7 0,09 und Nr. 8 0,07.

Die angeführten Resultate lassen erkennen, dass sich die verschiedenen Pilze nicht gleichmässig gegen Rubidiumsalze verhalten. Botrytis stimmt mit dem von Benecke untersuchten Aspergillus hier überein, während bei Rhizopus keinerlei Vertretbarkeit des Kaliumsalzes durch die Salze des Rubidiums- und Cäsiums zu bemerken ist.

II. Sind Magnesiumverbindungen als Nahrung für Pilze immer notwendig, oder sind dieselben durch Verbindungen anderer Elemente zu ersetzen?

Die eingangs erwähnte von Nägeli postulierte Vertretbarkeit des Magnesiums durch Calcium, Strontium oder Baryum in Pilznährlösungen wurde zuerst von Ad. Meyer eingeschränkt, der darauf hinwies, dass für Hefen das Magnesium bedeutungsvoller sei als das Calcium. Auch Winogradsky fand, dass Mycoderma vini das Magnesium durchaus nötig habe, während Calcium, Strontium und Baryum bedeutungslos seien. In jüngster Zeit haben Benecke und Molisch dem Magnesium eine wichtige Rolle im Ernährungsprozess der Schimmelpilze zugeschrieben und konstatiert, dass dasselbe nicht von anderen Elementen vertreten werden kann; auch Wehmer ist für die Bedeutungslosigkeit der Calciumsalze in dieser Hinsicht eingetreten.

Zur Kontrolle dieser neueren Ansicht stellte ich mit meinen drei Versuchspitzen analoge Kulturen an, von denen ich jedoch, da alle drei Spezies hierin übereinstimmen, nur den Versuch mit Rhizopus genauer unter Tabelle VIII anführen will. Es ist zunächst allerdings nur an eine Vertretbarkeit der Magnesium-

Tab. VIII.

Rhizopus nigricans.

Nährlösung: Rohrzucker 2,5 %, Chlorammonium 0,25 %, Dithionsaures Natrium 0,025 %, primäres phosphorsaures Kalium 0,025 %. Eisenchlorid Spur.

No.	Flüssigkeits-Volumen cbcm	Zusatz in %	Makroskopisch sichtbare Keimung nach Tagen	Mycel steril nach Tagen	Mycel fertil nach Tagen	Trockengewicht nach 10 Tagen	Bemerkung.
1	50	$MgSO_4$ 0,0087	2	3	4	0,201	
2	50	$Mg(NO_3)_2$ 0,01	2	3	4	0,183	
3	50	$Ca(NO_3)_2$ 0,0085	5 (etwas Mycel in der Flüssigkeit)	—	—	—	
4	50	$Sr(NO_3)_4$ 0,0076	5 „	—	—	—	
5	50	$Ba(NO_3)_2$ 0,0094	—	—	—	—	
6	50	$MgSO_4$ 0,00087	2	3	4	0,184	
7	50	$Mg(NO_3)_2$ 0,001	2	3	4	0,176	
8	50	$Ca(NO_3)_2$ 0,00085	5 (etwas Mycel in der Flüssigkeit)	—	—	—	
9	50	$Sr(NO_3)_2$ 0,00076	5 „	—	—	—	
10	50	$Ba(NO_3)_2$ 0,00094	5 (Flüssigkeit trüb)	—	—	—	
11	50	$BeCl_2$ 0,0055	—	—	—	—	
12	50	$ZnSO_4$ 0,0105	—	—	—	—	
13	50	$CdSO_4$ 0,006	—	—	—	—	

salze durch Salze der Erdalkalimetalle zu denken, jedoch habe ich zugleich auch die im periodischen System mit dem Magnesium in der 2. Gruppe stehenden Elemente mit eingeschlossen. Die Tabelle lässt klar erkennen, dass das Magnesiumsalz durch keines der Salze der 2. Gruppe des periodischen Systems ersetzt werden kann. Mit Calcium oder Strontiumsalz fand immer noch etwas Mycelbildung statt. Ich glaubte dies geringe Wachstum dem Rohrzucker zuschreiben zu müssen, der, wie früher erörtert, verdächtig war, Magnesiumspuren zu enthalten; doch ergaben Kulturversuche mit Glycerin, das ich für unbedingt magnesiumfrei hielt, dasselbe Resultat. In den weiteren Kontrollgläsern, die essigsaures Ammonium als Kohlenstoffquelle enthielten, wuchs mit oder ohne Magnesiumsalz leider absolut nichts; dies bedaure ich hier um so mehr, als Molisch mit Penicillium in essigsaurer Ammoniumlösung selbst nach einem Monat ohne Magnesiumzusatz nicht die geringste Keimung erhielt, dies Präparat also ideal magnesiumfrei zu sein scheint, während es wohl keinem Zweifel unterliegt, dass die teilweise Entwicklung des Pilzes auf Rechnung der Magnesiumspuren der organischen Präparate zu setzen ist, von welchen der Zucker wie das Glycerin trotz sorgfältiger Reinigung nicht zu befreien war. Die Grenze der Empfindlichkeit des Rhizopus für schwefelsaures Magnesium liegt bei $^5/_{1000}$ mgr, ist also etwa 20 mal stärker als für Chlorkalium; das Maximum, bei der der Pilz noch gedieh, fand ich bei 15%. Salpetersaures Magnesium ist durchaus nicht so zuträglich für das Wachstum des Rhizopus als das schwefelsaure Salz; schon die Tabelle weist niedere Erntegewichte mit diesem

Tab. IX. **Rhizopus nigricans.**

Nährlösung: Rohrzucker 2,5 %, Chlorammonium 0,25 %, schwefelsaures Kalium 0,025 %, primäres phosphorsaures Kalium 0,025 %, Eisenchlorid Spur.

No.	Flüssigkeits-Volumen cbcm	Zusatz in %		Makroskopisch sichtbare Keimung nach Tagen	Mycel steril nach Tagen	Mycel fertil nach Tagen	Trockengewicht nach 8 Tagen	Bemerkung.
1	55	$MgSO_4$	0,0000001	3 (Mycel in der Flüssigkeit)	—	—	0,003	Wahrscheinlich durch den Magnesiumgehalt d. Zuckers entstanden.
2	52,5	„	0,0000005	3 „	—	—	0,0045	
3	55	„	0,000001	2	4	—	0,009	
4	52,5	„	0,000005	2	4	5	0,026	
5	55	„	0,00001	2	3	2 Fruchtträger 4 ca. 20 Fruchtträger später mehr	0,060	
6	52,5	„	0,00005	2	3	4	0,064	
7	55	„	0,0001	2	3	4	verunglückt	
8	55	„	0,001	2	3	4	0,120	
9	50	„	0,01	2	3	4	0,114	
10	50	„	0,1	2	3	4	verunglückt	
11	55	$Mg(NO_3)_2$	0,0000098	3	—	—	0,0046	
12	55	„	0,000089	2	4	—	,0,0091	
13	55	„	0,000089	2	3	—	0,0092	
14	55	„	0,0089	2	3	4	0,0086	
15	50	„	0,0089	2	3	2 Fruchtträger 4	0,096	
16	50	„	0,089	2	3	4	0,081	

Salze im Vergleich zu äquivalenten Mengen des schwefelsauren Salzes auf. Sehr deutlich spricht sich dies im Maximum aus, welches Rhizopus ertragen kann; es beträgt dies für salpetersaures Magnesium 5 %. Mein Resultat über Magnesiumsalze stimmt also völlig mit den neueren Befunden überein.

Die Salze der übrigen Elemente der Magnesium- und Zinkgruppe.

Was die jetzt folgenden Elemente anlangt, so lehren alle in dieser Arbeit bereits angeführten Versuche, dass dieselben für die Ernährung der Pilze nicht notwendig sind; es waren ja alle Nährlösungen, in denen sich die Pilze normal entwickelten, frei von diesen Salzen. Sie sind jedoch nicht ohne Einfluss auf das Wachstum der Pilze und ich habe ihr Verhalten zu Rhizopus in guten Nährlösungen untersucht. Als Nährlösung wurde dabei stets benutzt:

25 g Rohrzucker
2,5 g Chlorammonium
0,25 g salpetersaures Magnesium
0,25 g primäres phosphorsaures Kalium
0,25 g dithionsaures Natrium

nebst einer Spur Eisenchlorid in 1 Liter Wasser. Schwefel durfte hier nicht in der bisher verwendeten Form eines Sulfates geboten werden, weil sonst die Schwefelsäure durch die verwendeten Calcium-, Strontium- oder Baryumsalze gefällt worden wäre.

Als direkt schädlich für das Wachstum des Rhizopus erwies sich das Kadmiumsalz, wovon schon $^1/_{10}$ mgr in 100 cbcm Nährlösung genügte, die Bildung von Luftmycel und Sporen zu verhindern. In Anbetracht

der Thatsache, dass schon diese starke Dünnung so nachteiligen Einfluss äusserte, darf man wohl das Kadmiumsalz als ein starkes Gift für Pilze bezeichnen.

Für gleichfalls giftig halte ich die Zinksalze — sowohl schwefelsaures wie chlorwasserstoffsaures Zink —, von welchen Rhizopus nicht mehr als $^1/_{100}$ gr in 100 cbbm Nährlösung vertragen kann. Molisch hat mit Aspergillus niger in 0,04% Zinksulfatlösung noch reichliche Entwicklung erzielt; es scheint daher Aspergillus weit widerstandsfähiger gegen Zinksalze zu sein als die von mir untersuchte Mucorinee.

Die Grenze des Wachstums von Rhizopus fand ich für Berylliumchlorid bei 0,2%, für salpetersaures Baryum bei 1%, für salpetersaures Strontium bei 1,5% und für salpetersaures Calcium bei 4%.

Berylliumsalze schädigen von vorneherein das Wachstum. Bei einen Zusatz solcher bekommt der Pilz alsbald ein kränkliches Aussehen. Dieselbe Beobachtung ergiebt sich bei Zusatz von Strontiumsalzen.

Dass wir hier thatsächlich mit Wirkungen der betreffenden Salze zu rechnen haben und nicht nur mit Konzentrationsverhältnissen allein, wird ersichtlich, wenn man diese niedrigen Zahlen der letzten Salze vergleicht mit den hohen der Kalium- oder Natriumsalze, bei denen Rhizopus noch zu gedeihen vermag.

III. Sind Schwefelverbindungen immer als Nahrung für Pilze nötig, oder sind dieselben durch Verbindungen chemisch verwandter Elemente zu ersetzen?

Der Schwefel zählt zu den unentbehrlichen Nährelementen für grüne Pflanzen; er ist ein Bestandteil

Tab. X. **Rhizopus nigricans.**

Nährlösung: Glycerin 2,5 %, Chlorammonium 0,25 %, salpetersaures Magnesium 0,025 %, primäres phosphorsaures Kalium 0,025 %, Eisenchlorid Spur.

No.	Flüssigkeits-Volumen cbcm	Zusatz in %	Makroskopisch sichtbare Keimung nach Tagen	Mycel steril nach Tagen	Mycel fertil nach Tagen	Trockengewicht nach 20 Tagen	Bemerkung.
1	50	—	5 (etwas Mycel in der Flüssigkeit)	—	8 einzelne Fruchtträger	0,004	
2	55	Na_2SO_4 0,0000001	4	5	10	0,067	
3	52,5	„ 0,0000005	4	5	10	0,058	
4	55	„ 0,000001	4	5	verunglückt	—	
5	52,5	„ 0,000005	4	5	verunglückt	—	
6	55	„ 0,00001	4	5	6	0,120	
7	52,5	„ 0,00005	4	5	6	0,143	
8	55	„ 0,0001	4	5	6	0,122	
9	55	„ 0,001	4	5	6	0,144	
10	50	„ 0,01	4	5	6	0,132	
11	50	„ 0,1	4	5	6	0,112	
12	52,5	Na_2SeO_4 0,0000005	6 (etwas Mycel in der Flüssigkeit)	—	—	0,005	
13	55	„ 0,000001	6 „	—	—	0,0062	
14	52,5	„ 0,000005	6 „	—	—	0,0031	
15	55	„ 0,00001	6 (Flüssigkeit trüb)	—	—	—	
16	52,5	„ 0,00005	—	—	—	—	
17	55	„ 0,0001	—	—	—	—	
18	52,5	„ 0,0005	—	—	—	—	

der Eiweissstoffe und darum ist es sehr wahrscheinlich, dass ihn auch die Pilze notwendig zur normalen Vegetation bedürfen. Untersuchungen, den Schwefel in Pilznährlösungen durch verwandte Elemente, zu denen in unserem Falle nur Selen und Tellur zu zählen sind, zu vertreten, liegen bis heute nicht vor. Das Ergebnis meiner Untersuchungen in diesem Sinne ist folgendes: 1. schwefelsaures Salz ist als Nahrung für Rhizopus unbedingt notwendig und 2. schwefelsaures Salz kann nicht durch selensaures Salz ersetzt werden. Bei Beginn dieser Untersuchungen hatte ich die Zuckernährlösung verwendet. Es stellte sich jedoch bald heraus, dass mit diesem organischen Präparate stets ein bedeutendes, fast normales Wachstum ohne Schwefelzusatz auftrat, während sich mit Glycerin als Kohlenstoffquelle niemals ohne Schwefelzusatz Luftmycel und nur selten einige Sporen einstellten; das Mycel in der Flüssigkeit war hier so reduziert, dass es meist mit blossem Auge kaum zu erkennen war. Die genaue Grenze festzustellen, bei der Schwefel noch deutlich vom Pilz empfunden wird, war mir nicht möglich; es scheinen enorm kleine Mengen Schwefel zu genügen, um ein normales Wachstum des Rhizopus zu veranlassen. $^1/_{100}$ mgr schwefelsaures Natrium lieferte in Glycerinnährlösung bereits nach 6 Tagen wohlausgebildetes Luftmycel mit reichlichen Sporen, während nach längerer Zeit auch geringere Mengen dieses Salzes ansehnliche Pilzmassen erzeugten. Ein Gehalt über 0,001 % schwefelsauren Natriums hat keinen fördernden aber auch keinen hemmenden Einfluss auf die Entwicklung dieser Mucorinee. Überhaupt konnte nie durch zu grossen Zusatz von schwefelsaurem Salze

Tab. XI. **Rhizopus nigricans.**

Nährlösung: Rohrzucker 2,5 %, Chlorammonium 0,25 %, schwefelsaures Magnesium 0,025 %, Kaliumnitrat 0,025 %, Eisenchlorid Spur.

No.	Flüssigkeits-Volumen cbcm	Zusatz in %	Makroskopisch sichtbare Keimung nach Tagen	Mycel steril nach Tagen	Mycel fertil nach Tagen	Trockengewicht nach 8 Tagen	Bemerkung.
1	50	—	3 (Flüssigkeit trüb)	—	—	—	
2	55	NaH_2PO_4 0,0000001	3	—	5	0,008	
3	52,5	„ 0,0000005	3	4	5	0,009	
4	55	„ 0,000001	3	—	—	0,005	
5	52,5	„ 0,000005	2	3	verunglückt	—	
6	55	„ 0,00001	2	3	4	0,086	
7	52,5	„ 0,00005	2	3	4	0,128	
8	55	„ 0,0001	2	3	4	0,084	
9	52,5	„ 0,0005	2	3	4	0,097	
10	55	„ 0,001	2	3	4	0,120	
11	50	„ 0,01	2	3	4	0,142	
12	50	„ 0,1	2	3	4	0,135	
13	50	Na_3AsO_4 0,001	3 (Flüssigkeit trüb)	—	—	—	
14	50	$K_2H_2Sb_2O_7$ 0,001	—	—	—	—	

eine direkt nachteilige Wirkung — (siehe unter K_2SO_4 und Na_2SO_4) — beobachtet werden. Dieselbe Tabelle zeigt uns auch, dass das schwefelsaure Salz nicht durch selensaures Salz vertretbar ist. In Gläsern mit ganz geringem Gehalt an selensaurem Natrium, wuchs etwa ebenso wenig Pilzmasse als ohne dieses Salz. Ein Gehalt von 0,0005 % selensaurem Salz unterdrückte jedoch jede Keimung. Die Grenze der selensauren Salze, bei der Rhizopus in vollständiger Nährlösung gedeiht ist, 0,01 %. Tellursalze habe ich nicht untersucht.

IV. Sind Phosphorverbindungen als Nahrung für Pilze immer notwendig oder sind dieselben durch Verbindungen anderer Elemente zu ersetzen?

Ebenso wie Schwefel steht Phosphor in inniger Beziehung zu den Eiweissstoffen und ist insbesondere ein Bestandteil der Nukleine. Seine Notwendigkeit als Nährstoff für grüne Pflanzen wie für Pilze ist noch nicht angezweifelt worden. Meinen Kontrollversuch mit Rhizopus zeigt die Tabelle XI, aus der zugleich hervorgeht, dass an eine Vertretbarkeit des phosphorsauren Salzes durch arsensaures oder antimonsaures Salz nicht zu denken ist. Gerade so wie von schwefelsaurem Salze eine geringe Menge genügt, den Pilz zur normalen Entwicklung zu bringen, bedarf es auch bei phosphorsaurem Salze nur sehr kleiner Mengen zur Bildung ansehnlicher Pilzmengen. Ich konnte zu diesen Versuchen meine Zuckernährlösung wieder verwenden, da in derselben ohne Zusatz eines phosphorsauren Salzes kaum Keimung eintrat. Ebensowenig wie schwefel-

saures Natrium schadet primäres phosphorsaures Natrium in grossen Mengen dem Pilze, während sekundäres phosphorsaures Natrium infolge Alkalisierung der Nährlösung schon bei 2% schädlich wirkt.

Am Ende unserer Betrachtung angelangt, werfen wir noch einen kurzen Blick auf die Eisensalze. Bei allen angeführten Versuchen setzte ich der Nährlösung eine Spur Eisenchlorid zu, weil ich aus Erfahrung wusste, dass Pilze in Nährlösungen mit geringem Eisengehalt besser gedeihen als ohne diesen Stoff. Soweit ich mit meinen Nährmedien beurteilen konnte, hatte Kupfersulfat in schwacher Lösung dieselbe Eigenschaft als Eisensulfat — beide Salze wirkten gleich fördernd als Reizmittel. Auf den Standpunkt Molischs, dass ohne Eisensalze Pilze nicht gedeihen könnten, möchte ich mich aber doch noch nicht stellen, obwohl dieser Autor mit Exaktheit die Notwendigkeit eines Eisensalzes in Pilznährlösungen, allerdings nur für essigsaures Ammonium dargethan hat. Wie schon erwähnt, gedieh keines meiner Versuchsobjekte in dieser so reinen organischen Salzlösung, weshalb ich von einer eingehenden Prüfung in der Eisenfrage absehen musste. In Rohrzucker, Traubenzucker, Leucin sowie Asparaginlösungen, in denen kein Eisen nachgewiesen werden konnte, gedieh der Pilz ohne Eisensalz völlig normal, auf Zusatz von Eisensalz war das Wachstum allerdings intensiver. Ich schreibe dem Eisen kaum andere Eigenschaften zu als dem Kupfersalz.

Zusammenfassung der Resultate.

1. Übereinstimmung aller Pilzkulturen herrscht darin, dass bei höherer Konzentration der Salzlösung die Schnelligkeit des Wachstums abnimmt.

2. Zu einer guten Nährlösung für Pilze ist von anorganischen Bestandteilen ein Kaliumsalz, ein Magnesiumsalz, eine schwefel- und eine phosphorhaltige Verbindung notwendig.

3. Die Kaliumsalze können nicht durch Natrium-, Lithium-, Kupfer, Rubidium- oder Cäsiumsalze ersetzt werden. Das Rubidiumsalz ist befähigt, das Kaliumsalz zum Teil bei Kulturen von Botrytis cinerea zu vertreten, nicht aber bei solchen von Rhizopus nigricans.

4. Kupfersalze begünstigen in starker Verdünnung das Wachstum der Pilze, ein grösserer Gehalt an Kupfersalz wirkt aber giftig.

5. Die Magnesiumsalze können nicht durch Calcium, Strontium, Baryum, Beryllium, Zink oder Kadmiumsalze ersetzt werden. Das Verhältnis der Schädlichkeit dieser Salze bestimmt sich nach der angegebenen Reihenfolge, sodass das Kadmiumsalz als das nachteiligste von allen untersuchten Mineralien angesehen werden muss.

Lebenslauf.

Ich, Ernst Karl Franz Günther wurde am 1. April 1870 als Sohn des damaligen Apothekenbesitzers Arthur Günther und seiner Ehefrau Pauline geb. Schmidt geboren und protestantisch erzogen. Zunächst besuchte ich die höhere Knabenschule meines Heimatsortes, später das königl. Gymnasium zu Erfurt. W.-S. 1893/94 bezog ich die Universität München und nach 4 Semestern Erlangen, wo ich am 10. März 1897 promoviert wurde.